

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-213300

(43)Date of publication of application : 15.08.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
C12N 15/09
// A61B 10/00

(21)Application number : 06-034162

(71)Applicant : S R L:KK

(22)Date of filing : 07.02.1994

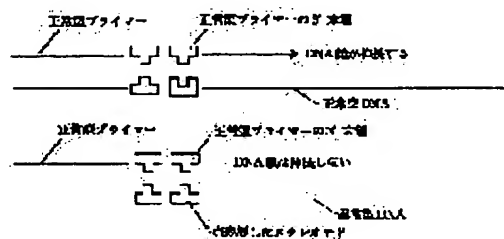
(72)Inventor : AOSAKI RYYOUJI
KAWAGUCHI RYUJI

(54) METHOD FOR DETECTING POINT MUTATION OF DNA AND PRIMER USED THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for clearly and repeatably detecting the point mutation of a DNA.

CONSTITUTION: A method for detecting a point mutation in a specimen DNA comprises applying the specimen DNA to a gene-multiplying method using both a normal type primer and an abnormal type primer and detecting whether the specimen DNA is multiplied or not, when each primer is used. In the method for detecting the point mutation of the DNA, the 3'-terminals of the normal type primer and the abnormal type primer correspond to nucleotides, respectively, in which the presence of the point mutation is estimated. The normal type primer has a base sequence perfectly complementary to the end region of the multiplication region of the normal type DNA except the second nucleotide base from the 3'-end of the primer, and the abnormal type primer has a base sequence perfectly complementary to the end region of the multiplication region of the abnormal type DNA except the second nucleotide base of the 3'-end of the primer.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-213300

(43) 公開日 平成7年(1995)8月15日

(51) IntCl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4B		
C 1 2 N 15/09				
// A 6 1 B 10/00	H	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平6-34162

(22) 出願日 平成6年(1994)2月7日

(71) 出願人 390037006

株式会社エスアールエル

東京都立川市曙町二丁目41番19号

(72) 発明者 青崎 量二

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア

ールエル八王子ラボラトリー内

(72) 発明者 川口 竜二

東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア

ールエル八王子ラボラトリー内

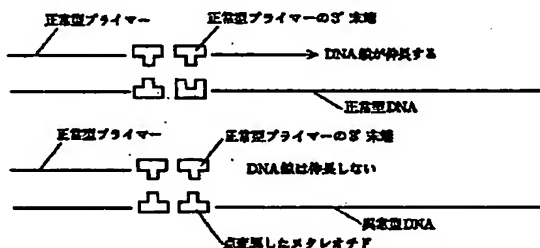
(74) 代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54) 【発明の名称】 DNAの点変異の検出方法及びそれに用いられるプライマー

(57) 【要約】

【目的】 明確に、かつ再現性よくDNAの点変異を検出することができる方法を提供すること。

【構成】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法であって、前記正常型プライマー及び前記異常型プライマーは、そのそれぞれの3'末端が、点変異が予想されるヌクレオチドに対応するものであり、前記正常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有し、前記異常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有する、DNAの点変異の検出方法を提供した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法であって、前記正常型プライマー及び前記異常型プライマーは、そのそれぞれの3'末端が、点変異が予想されるヌクレオチドに対応するものであり、前記正常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有し、前記異常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有する、DNAの点変異の検出方法。

【請求項2】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法であって、前記正常型プライマー及び前記異常型プライマーは、そのそれぞれの3'末端が、点変異が予想されるヌクレオチドに対応するものであり、前記正常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有し、前記異常型プライマーは、異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有する、DNAの点変異の検出方法。

【請求項3】 前記正常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドは、前記正常型DNAの対応ヌクレオチドと同一骨格の塩基を有する請求項2記載の方法。

【請求項4】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法であって、前記正常型プライマー及び前記異常型プライマーは、そのそれぞれの3'末端が、点変異が予想されるヌクレオチドに対応するものであり、前記正常型プライマーは、正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有し、前記異常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有する、DNAの点変異の検出方法。

【請求項5】 前記異常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドは、前記異常型DNAの対応ヌクレオチドと同一骨格の塩基を有する請求項4記載の方法。

【請求項6】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法に用いられる正常型プライマーであって、その3'末

端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有するプライマー。

【請求項7】 正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法に用いられる異常型プライマーであって、その3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有するプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、DNAの点突然変異の検出方法及びそれに用いられるプライマーに関する。本発明は、遺伝病の診断等に有用である。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子の点突然変異により引き起こされる遺伝病が種々知られており、それらの中には、遺伝子のどの部位がどのように点突然変異することにより遺伝病が引き起こされるかわかっているものも少なくない。このような予想される点突然変異を検出する方法として、従来より、遺伝子増幅法（PCR（polymerase chain reaction）法）を利用した遺伝子の点突然変異の検出方法が知られている。この方法では、遺伝子増幅法に用いる一対のプライマーのうち、一方のプライマーとして、正常型の遺伝子の増幅領域の端部領域に完全に相補的な正常型プライマーと、異常型の遺伝子の増幅領域の端部領域に完全に相補的な異常型プライマーとを用いる。異常型のプライマーは、その3'末端が、予想される点突然変異を起こしたヌクレオチドに相補的なヌクレオチドになっている。このような正常型及び異常型プライマーをそれぞれ別個に用いて試料遺伝子を遺伝子増幅法にかける。試料遺伝子が正常型であれば、正常型プライマーを用いた場合にはDNAの増幅が起きるが、異常型プライマーを用いた場合には、プライマーの3'末端が試料遺伝子の対応ヌクレオチドと相補的ではない（ミスマッチ）のでDNA鎖の伸長が起きず、DNAの増幅は起きない。一方、試料遺伝子が異常型であれば、逆に、正常型プライマーを用いた場合には増幅が起きず、異常型プライマーを用いた場合に増幅が起きる。従って、各プライマーを用いた場合に増幅が起きるか否かを調べることにより、試料遺伝子が正常型か異常型かを判別することができ、それによって試料遺伝子中の点突然変異を検出することができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 上記した原理によれば、従来法により明確に点突然変異の検出が行えるように思われるが、実際には、正常型プライマーと異常型プライマーとはわずか1塩基の相違があるのみであり、異

常型プライマーを用いて正常型遺伝子を増幅した場合及び正常型プライマーを用いて異常型遺伝子を増幅した場合にもある程度の増幅が起きることが多く、明確な判定が困難となる場合が少なくない。また、ミスマッチプライマーを用いた場合に増幅が起きるか否かは、用いる機器の種類やその他の微妙な条件によって左右され、再現性も低い。従って、ミスマッチプライマーを用いた場合に増幅が完全に起こらないようにするためには、遺伝子増幅時の温度条件等を極めて厳密に制御する必要がある、かなり困難な作業になる。

【0004】従って、本発明の目的は、明確に、かつ再現性よくDNAの点変異を検出することができる方法及びそのための試薬を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、上記の従来法において、正常型プライマーが異常型DNAとハイブリダイズする際及び異常型プライマーが正常型DNAとハイブリダイズする際に、プライマーの3'末端のみならず、3'末端から2番目のヌクレオチドもミスマッチさせることにより、厳密な反応条件の制御を行わなくともDNA鎖の伸長、ひいてはDNAの増幅を完全に阻害することができ、明確な判定が可能となることを見出し本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、正常型のプライマーと異常型のプライマーをそれぞれ用いた遺伝子増幅法に試料DNAをかけ、各プライマーを用いた場合に試料DNAが増幅されるか否かによって、その試料DNA中の点変異を検出する方法であって、前記正常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き正常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有し、前記異常型プライマーは、該プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基を除き異常型DNAの増幅領域の端部領域と完全に相補的な塩基配列を有する、DNAの点変異の検出方法を提供する。さらに、本発明は、この方法に用いることができる正常型プライマー及び異常型プライマーを提供する。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】遺伝子増幅法(PCR法)は、試料DNA、4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、一対のプライマー及び耐熱性DNAポリメラーゼの存在下で、変性、アニーリング、伸長の3工程からなるサイクルを繰り返すことにより、上記一対のプライマーで挟まれる試料DNAの領域を指数関数的に増幅させる方法である。すなわち、変性工程で試料の二本鎖DNAを変性(一本鎖二本に解離)し、続くアニーリング工程において各プライマーと、それぞれに相補的な一本鎖試料DNA上の領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程で、各プライマーを起点としてDNAポリメラーゼの働きにより鋳型となる各一本鎖試料DNAに相補的なDNA鎖を伸長

させ、二本鎖DNAとする。この1サイクルにより、一本の二本鎖DNAが2本の二本鎖DNAに増幅される。従って、このサイクルをn回繰り返せば、理論上、上記一対のプライマーで挟まれた試料DNAの領域は 2^n 倍に増幅される。増幅されたDNA領域は大量に存在するので、電気泳動等の方法により容易に検出できる。よって、遺伝子増幅法を用いれば、従来では検出不可能であった、極めて微量(1分子でも可)の試料DNAをも検出することが可能であり、最近非常に広く用いられている技術である。

【0009】上記の遺伝子増幅法を利用した本発明の方法では、正常型DNAを増幅できる正常型プライマーと、異常型DNAを増幅できる異常型プライマーをそれぞれ別個に用いて遺伝子増幅法を行う。なお、ここで、異常型DNAとは、正常型DNAのうちの1つのヌクレオチドのみが点変異して他のヌクレオチドに置換されているものであり、どの部位のヌクレオチドが変異しているかわかっているものである。遺伝病の中にはこのような遺伝子の点変異により引き起こされるものがわかって

いるものも多く、どの部位のヌクレオチドがどのヌクレオチドに点変異しているかわかっているものも少なくない。本発明の方法は、試料DNAがこのような予想される点変異を起こしているか否かを検査する方法である。

【0010】なお、遺伝子増幅法を行うためには、常に一対のプライマーが必要であるから、正常型プライマーを用いて遺伝子増幅を行う場合でも、異常型プライマーを用いて遺伝子増幅を行う場合でも、対になる第3のプライマーが必要であることは言うまでもない。すなわち、遺伝子増幅法は正常型プライマー/第3のプライマーの組合せ及び異常型プライマー/第3のプライマーの組合せをそれぞれ用いて別個に行われる。ここで第3のプライマーは、点変異とは全く無関係な領域にハイブリダイズするものであり、正常型プライマーの対になる第3のプライマーと異常型プライマーの対になる第3のプライマーとは同一でも異なってもよい。もっとも、同一のプライマー(すなわち共通のプライマー)を用いる方がプライマーの調製の手間が省ける。

【0011】正常型プライマーを用いて試料DNAを増幅した場合、試料DNAが正常型であれば増幅が起きるが、異常型では増幅が起きない。逆に、異常型プライマーを用いて試料DNAを増幅した場合、試料DNAが異常型であれば増幅が起きるが、正常型であれば増幅は起きない。従って、1つの試料を2つに分け、一方は正常型プライマーを用いて増幅を行い、他方は異常型プライマーを用いて増幅を行い、増幅が起きたか否かを調べることで、試料DNAが正常型であるか異常型であるかを明確に知ることができる。特に、ヒトを始め、高等生物は、1種類の遺伝子について、父親由来の遺伝子と母親由来の遺伝子をそれぞれ1つずつ有しているが、こ

の方法によれば、試料遺伝子が正常型のホモか、異常型のホモか、ヘテロかを区別することもできる（ヘテロの場合には、正常型遺伝子と異常型遺伝子が共に存在するから正常型プライマーを用いた場合も異常型プライマーを用いた場合も増幅が起きる）。

【0012】これまで説明したことは従来法とも共通するものであるが、上述のように、従来法では、正常型プライマー／異常型DNA及び異常型プライマー／正常型DNAの組合せにおいて、プライマーの3'末端のみが鋳型DNAと非相補的（ミスマッチ）になっている（すなわち、プライマーの3'末端が試料DNAの予想される点変異部位に対応する）ので、これらの組合せにおいても試料DNAが増幅される場合がある。このような場合には、試料DNAが正常型か異常型かを判別することが困難になる。この問題を解決すべく、本発明では、プライマーの配列に工夫がなされている。すなわち、本発明のプライマーでは、上記組合せにおいて、プライマーの3'末端のみならず、3'末端から2番目のヌクレオチドも鋳型DNAとミスマッチとなるように設計されている（ダブルミスマッチ）。このように設計した場合、正常型DNAと異常型DNAとは1つのヌクレオチドが点変異しているだけで他の配列は完全に同一であるので、正常型プライマー／正常型DNA及び異常型プライマー／異常型DNAの組合せにおいても、プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドはミスマッチになる。しかしながら、3'末端から2番目のヌクレオチドのみがミスマッチであっても、遺伝子増幅法によりDNAの増幅が起きることがわかった。

【0013】上記した本発明の原理を図1及び図2に基づき説明する。図1には、正常型プライマーを用いた場合が模式的に示されている。図1に模式的に示されるように、正常型DNAと異常型DNAは、点変異した単一のヌクレオチドが異なるのみであり、その他の部分は完全に同一である。点変異するヌクレオチドが正常型では凹で、異常型では凸で示されている。一方、正常型プライマーは、その3'末端が点変異することがあるヌクレオチドに対応するヌクレオチドになっている。正常型プライマーの3'末端は点変異していない正常型DNAの対応ヌクレオチドに相補的であるから、図示のように凸で示されている（すなわち、凹-凸が相補的な塩基の組合せ（すなわち、A-T又はG-C）を示し、凸-凸又は凹-凹が非相補的な塩基の組合せ（すなわち、A-T及びG-C以外の組合せ）を示す）。すなわち、正常型プライマーの3'末端は正常型DNAの対応ヌクレオチドとは相補的であるが、異常型DNAの対応ヌクレオチドとは非相補的である。この点は従来法と同様である。本発明の方法では、正常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドの塩基も試料DNAの対応ヌクレオチドの塩基と非相補的になっている（図では凸-凸で示される）。なお、プライマーの3'末端から2番目のヌ

クレオチドに対応する試料DNAのヌクレオチドは、点変異するヌクレオチドではないので正常型DNAでも異常型DNAでも同じである（図では凸で示される）。なお、正常型プライマーの3'末端から2番目の塩基以外の塩基配列は、正常型DNAの対応領域（すなわち、遺伝子増幅法により増幅される領域の端部領域）と完全に相補的である。従って、図示のように、正常型プライマー／正常型DNAの組合せでは、プライマーの3'末端から2番目の塩基のみがミスマッチとなる。この場合には、遺伝子増幅法によりプライマーの3'末端に続いてDNA鎖が伸長する。一方、正常型プライマー／異常型DNAの組合せでは、プライマーの3'末端及び3'末端から2番目の2つのヌクレオチドがミスマッチ（ダブルミスマッチ）となり、遺伝子増幅法においてプライマーの3'末端に続くDNA鎖の伸長は起きない。3'末端のミスマッチであっても、従来法のようにシングルミスマッチの場合にはDNA鎖の伸長が起きることがあるが、本発明では、ダブルミスマッチとなっているので、DNA鎖の伸長は完全に阻害される。

【0014】一方、図2に示されるように、異常型プライマーは、その3'末端が凹になっており、正常型DNAの対応ヌクレオチドとは非相補的で異常型DNA対応ヌクレオチドとは相補的になっている。異常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドは、正常型プライマーと同様に、試料DNAの対応ヌクレオチドとは非相補的になっている。なお、異常型プライマーの3'末端から2番目の塩基以外の塩基配列は、異常型DNAの対応領域（すなわち、遺伝子増幅法により増幅される領域の端部領域）と完全に相補的である。従って、図示のように、異常型プライマー／正常型DNAの組合せでは、プライマーの3'末端及び3'末端から2番目のヌクレオチドがダブルミスマッチとなってDNA鎖の伸長が起きないが、異常型プライマー／異常型DNAの組合せでは、プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドのみがミスマッチとなってDNA鎖の伸長が起きる。

【0015】このように、本発明の方法では、正常型プライマー／異常型DNA及び異常型プライマー／正常型DNAの組合せでは、ダブルミスマッチによりDNA鎖の伸長が完全に阻害され、一方、正常型プライマー／正常型DNA及び異常型プライマー／異常型DNAの組合せではDNA鎖の伸長が起きる。よって、本発明の方法によれば、従来法のように偽陽性を生じることなく、試料DNA中の点変異を明確に検出することができる。

【0016】上記した正常型プライマーと異常型プライマーの3'末端から2番目の塩基は同一であっても異なってもよい。また、正常型プライマーと異常型プライマーの長さは同一でも異なってもよい。正常型プライマーと異常型プライマーの長さが、下記実施例2の場合のように有意に異なっておれば、第3のプライマーとして共通のものをを用いた場合であっても、正常型プラ

イマーを用いて得た増幅産物と異常型プライマーを用いて得た増幅産物を混合し、この混合物を電気泳動にかけても増幅産物の大きさが異なるためにどちらのプライマーを用いて増幅が起きたかを知ることができ、電気泳動の手間を減らすことができる。また、正常型プライマーと異常型プライマーの長さが同じ場合でも、第3のプライマーとして異なったものを用い、増幅産物の長さが正常型プライマーを用いた場合と異常型プライマーを用いた場合とで異なるようにすれば同様の効果を得ることができる。

【0017】上述のダブルミスマッチを利用する点を除けば、本発明の方法は従来と同様に行うことができる。すなわち、正常型プライマー及び異常型プライマーは、オリゴデオキシヌクレオチドから成り、その長さは特に限定されないが、通常18～25ヌクレオチド、好ましくは18～20ヌクレオチド程度である。また、遺伝子増幅法の操作そのものは、この分野において周知であり、用いるプライマーの長さやプライマーと試料DNAとの親和性等を考慮して当業者ならば容易に条件を設定することができる。この場合、本発明の方法では、上述のように、ダブルミスマッチを利用することにより偽陽性の発生を完全に防止できるので、遺伝子増幅法の温度条件をそれほど厳密に設定しなくても正確な結果を得ることができる。換言すれば、異なる機器等を用いること等に起因して温度条件が多少ずれているような場合でも、再現性良く正確な判定結果を得ることができる。

【0018】これまでに説明した本発明の方法は、正常型プライマー及び異常型プライマーの両方ともダブルミスマッチを利用したものである。しかし、正常型プライマー／正常型DNAと正常型プライマー／異常型DNAの結合力の差が比較的大きい場合（塩基が対合した場合（非相補的に対合した場合も含む）、その結合力の強さは、各塩基の組合せによりそれぞれ異なるので、同じミスマッチといっても、結合力に強弱がある）には、遺伝子増幅法の温度条件を厳密に設定すれば、正常型プライマーの3'末端のみをミスマッチとした、従来の正常型プライマーを用いても点変異の検出が可能な場合がある。同様に、異常型プライマー／異常型DNAと異常型プライマー／正常型DNAの結合力の差が比較的大きい場合には、遺伝子増幅法の温度条件を厳密に設定すれば、異常型プライマーの3'末端のみをミスマッチとした、従来の異常型プライマーを用いても点変異の検出が可能な場合がある。従って、このような場合、正常型プライマー及び異常型プライマーのいずれか一方のみ上記ダブルミスマッチとした方法も本発明の方法に含まれる（請求項2及び4に記載）。なお、この場合に、正常型プライマーをダブルミスマッチとする場合には、正常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドとして前記正常型DNAの対応ヌクレオチドと同一骨格の塩基を有するものを用い、異常型プライマーをダブルミス

マッチとする場合には、異常型プライマーの3'末端から2番目のヌクレオチドとして異常型DNAの対応ヌクレオチドと同一骨格の塩基を有するものを用いることが好ましい。塩基の骨格が同一であれば、結合温度に差がないので、このようにすれば、正常型プライマーを用いた場合も異常型プライマーを用いた場合も同じ条件で遺伝子増幅法を行うことができるので好都合である。

【0019】本発明はまた、上述したダブルミスマッチを利用した、正常型プライマー及び異常型プライマーをも提供する。

【0020】本発明の方法は、遺伝病の原因となる遺伝子の点変異の検出や、ガン遺伝子、ガン抑制遺伝子等の検出に利用できる。また、本発明の方法により点変異が検出されるものは、必ずしも遺伝子に限定されるものでなく、遺伝子以外のDNAであってもよい。

【0021】

【実施例】以下、実施例に基づき本発明をより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】下記の実施例ではコレステリルエステル転送蛋白（CETP）遺伝子の点変異を検出した。高HDLコレステロール（高HDL-C）患者の多くではCETP遺伝子に異常が存在することが知られており、現在、イントロン14スプライスドナー部位中に一箇所の点変異が報告されている。すなわち、正常型遺伝子のGが異常型遺伝子ではAに変異している。下記の実施例及び比較例はいずれもこの点変異を検出すべく行った。

【0023】比較例1

(1) 試料の調製

高HDL-C患者及び健康人から遺伝子試料を調製した。これは次のように行った。EDTA・2ナトリウム採血を行った血液から低速遠心を行ってリンパ球を分離した。次にこのリンパ球から、フェノールクロロホルム抽出による除タンパク操作を行ってヒトゲノム遺伝子を抽出した。さらに、エタノール沈殿を行ってヒトゲノム遺伝子の精製を行った。0.1 μ g/ μ lの濃度に調整して、これを遺伝子試料とした。

【0024】(2) プライマーの調製

次の塩基配列を有する3種類のプライマーを市販のDNA合成機を用いて作製した。

共通のフォワードプライマー（14F）

5'-CATGAGGATGAATGCTTGTC-3'（20 mer）

正常型プライマー（14W1）

5'-CCCTCCAGCCCACTTAC-3'（20 mer）

異常型プライマー（14M1）

5'-CCCTCCAGCCCACTTAT-3'（20 mer）

正常型プライマー（14W1）の3'末端は、正常型遺伝子のGに相補的であり、一方、異常型プライマー（14M1）の3'末端は、異常型遺伝子のAに相補的になっている。14Fと14W1の組合せ又は14Fと14

M1のプライマーの組合せを用いて遺伝子増幅法を行うと、14Fと14W1又は14M1によって挟まれる187塩基対の領域が増幅される。

【0025】(3) 遺伝子増幅法 (PCR)

遺伝子増幅法に供した反応混合物の組成は次のとおりであった。共通のフォワードプライマー5 μ M、正常型又は異常型プライマー5 μ M、基質(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)各125 μ M、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001%(w/v)ゼラチン、遺伝子試料0.1 μ g、Taqポリメラーゼ0.5 unit、反応液量25 μ lで行った。この反応混合物を、変性(94 $^{\circ}$ C、1分)、アニーリング(66 $^{\circ}$ C、2分)のサイクルにかけ、30サイクル行った(なお、この系では、アニーリングと変性の間の機械の温度上昇中にDNA鎖が伸長されるため、伸長工程を別途設ける必要はなかった)。

【0026】(4) 検出

得られたPCR産物を常法に従ってアガロースゲル電気泳動にかけ、染色して増幅産物のバンドを検出した。その結果、下記表1に示す、3種類の結果が得られた。

【0027】

【表1】

表1

試料	正常型プライマー	異常型プライマー
1	増幅	増幅せず
2	増幅	増幅
3	弱く増幅	増幅

【0028】このように、試料2と3では、正常型プライマー及び異常型プライマーを用いたいずれの場合にもDNAの増幅が見られ、試料の遺伝子型を明確に判定することができなかった。

【0029】実施例1

上記比較例1において、異常型プライマーを用いた場合には、試料1では明確に「増幅せず」という結果が得られたので、上記の系では正常型プライマーにダブルミスマッチを導入すれば明確な検出が可能であると考えられる。従って、実施例1では、正常型プライマーにのみダブルミスマッチを導入し、異常型プライマーとしては比較例1と同じものを用いた。

【0030】すなわち、正常型プライマーとして次の塩基配列を有する14W2プライマーを用いた。

正常型プライマー (14W2)

5'-CCCTCCAGCCACACTTTC-3' (20 mer)

このように、14W2では、比較例1で用いた14W1と比較すると、3'末端から2番目の塩基が試料DNAと非相補的な塩基に置換しており、他の配列は14W1と同じである。

【0031】正常型プライマーとして上記14W2を用いることを除き、その他は比較例1と全く同様な操作を行った。結果を下記表2に示す。

【0032】

【表2】

表2

試料	正常型プライマー	異常型プライマー
1	増幅	増幅せず
2	増幅	増幅
3	増幅せず	増幅

【0033】この結果から、試料1が正常型のホモ接合体、試料2が正常型と異常型のヘテロ接合体、試料3が異常型のホモ接合体であることが判定された。このように、本発明によれば、従来法では不可能であった点変異の検出を明確に行うことができた。

【0034】実施例2

実施例2は、正常型プライマー及び異常型プライマーの両方ともにダブルミスマッチを導入した例である。正常型プライマーとしては、実施例1で用いた14W2を用いた。共通のフォワードプライマーとしては、下記塩基配列を有する14F3を用いた。また、異常型プライマーとしては、下記塩基配列を有する14M2を用いた。共通のフォワードプライマー (14F3)

5'-GGACTCACCATGGGCATTTC-3' (20 mer)

異常型プライマー (14M2)

5'-CTCGGCACCCAGTTTCCCTCCAGCCACACTTTT-3' (35 mer)

これらのプライマーを用いた場合、14F3と14W2の組合せではCETP遺伝子エクソン14を含む120塩基対の領域が増幅され、14F3と14M2の組合せではCETP遺伝子エクソン14を含む135塩基対の領域が増幅される。

【0035】14F3と14M2を用いた場合のアニーリング条件を65 $^{\circ}$ C、2分に変えたことを除き、比較例1と全く同様に遺伝子増幅法を行った。反応後、各反応混合物を混合し、常法によりアガロースゲル電気泳動にかけて、バンドを染色した。なお、上述のように、正常型プライマーを用いた場合には増幅産物の長さは120塩基対であり、異常型プライマーを用いた場合には増幅産物の長さは135塩基対であるので、単一のゲル上で電気泳動を行ったにもかかわらず、染色されたバンドが正常型プライマーを用いて増幅されたものか異常型プライマーを用いて増幅されたものかを容易に識別することができた。結果を下記表3に示す。

【0036】

【表3】

表 3

試料	正常型プライマー	異常型プライマー
1	増幅	増幅せず
2	増幅	増幅
3	増幅せず	増幅

【0037】この結果から、試料1が正常型のホモ接合体、試料2が正常型と異常型のヘテロ接合体、試料3が異常型のホモ接合体であることが判定された。このように、本発明によれば、従来法では不可能であった点変異の検出を明確に行うことができた。

【0038】

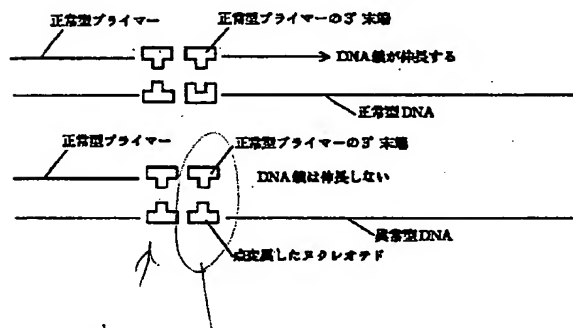
【発明の効果】本発明により、試料DNA中の点変異を明確に検出できる方法が提供された。本発明の方法では、ダブルミスマッチを利用することにより、偽陽性が生じないので、遺伝子増幅法の条件をそれほど厳密にしなくても再現性良く結果が得られ、機種の違い等によって判定結果が異なることはなくなった。また、本発明の方法によれば、従来法では不可能であったホモ接合とヘテロ接合の識別も可能になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法の一部を模式的に説明する図である。

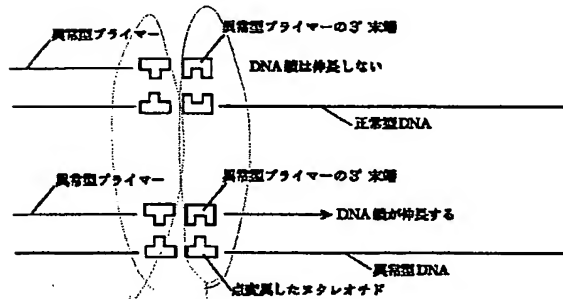
【図2】本発明の方法の他の一部を模式的に説明する図である。

【図1】



非
相
補
的
SNP部位。

【図2】



非
相
補
的
SNP部位。

THIS PAGE BLANK (USPTO)